



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet

Ph.D. értekezés tézisei

**MELOXIKÁM TARTALMÚ HORDOZÓ MENTES
PORINHALÁCIÓS RENDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS
VIZSGÁLATA PULMONÁLIS TERÁPIA CÉLJÁBÓL**

Chvatal Anita
gyógyszerész

Témavezetők:

Prof. Dr. Révész Piroska, MTA doktor, egyetemi tanár
és

Dr. Ambrus Rita Ph.D., egyetemi docens

**SZEGED
2019**

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszertechnológia Program
Programvezető: *Dr. Csóka Ildikó*, tanszékvezető egyetemi docens

Gyógyszertechnológiai Intézet
Témavezető: *Prof. Dr. Révész Piroska* és *Dr. Ambrus Rita*

Chvatal Anita

MELOXIKÁM TARTALMÚ HORDOZÓMENTES PORINHALÁCIÓS KÉSZÍTMÉNYEK FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATA PULMONÁLIS TERÁPIA CÉLJÁBÓL

Szigorlati bizottság:

Elnök: *Dr. Csóka Ildikó Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet
Tagok: *Dr. Kiss Dorottya Ph.D.*, Richter Gedeon Nyrt., Budapest
Dr. Zupkó István, MTA doktor, Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök: *Prof. Dr. Hohmann Judit*, MTA doktor, Szegedi Tudományegyetem,
Farmakognóziai Intézet
Opponensek: *Prof. Dr. Zelkó Romána*, MTA doktor, Semmelweis Egyetem,
Gyógyszerésztudományi Kar, Budapest
Dr. Nagy Attila Ph.D., Wigner Fizikai Kutatóközpont, Szilárdtestfizikai és
Optikai Intézet, Budapest
Titkár: *Dr. Doró Péter Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem, Klinikai
Gyógyszerészeti Intézet
Tag: *Dr. Ducza Eszter Ph.D.*, Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani
és Biofarmáciai Intézet

SZEGED
2019

1. BEVEZETÉS

A nem konvencionális gyógyszerformák közé tartozó, inhalációs készítmények alkalmazásának számos előnye ismert (*Somogyi et al., 2016*), többek között a minimális enzimatis inaktiváció, kevés hatóanyaggal nagy helyi koncentráció elérése, így a pulmonális gyógyszerbevitel különösen fontossá vált a tüdőbetegségek kezelésében (pl. COPD, tüdőfibrózis) (*Colombo et al., 2013*). A tüdőt érintő gyulladásos betegségek kezelésére alkalmasak lehetnek egyes nem szteroid gyulladáscsökkentők, önállóan vagy kombinációs terápiában más hatóanyagokkal (*Szabó-Révész et al., 2018; Pomázi et al., 2014*). A DPI-ok kiemelkedő stabilitása és biztonságos alkalmazása miatt elterjedté váltak az utóbbi évtizedekben a lokális és a szisztémás terápiában is (*Kondo et al., 2018*). A formulálás szempontjából, két nagyobb csoportosítás szerint, klasszikus hordozó alapú és úgynevezett hordozómentes rendszereket különböztetünk meg (*Zhou et al., 2012*). A legújabb fejlesztések a hordozómentes DPI részesítik előnyben, amelyeknél a megfelelő additívekkel alakítják ki a hatóanyagot is magába foglaló komplex szerkezetet (*Pilcer et al., 2010*). A hordozómentes készítmények így nem igényelnek nagyméretű, inert hordozókat a mikrométeres hatóanyagszemcsék megfelelő inhalációjához (*Healy et al., 2014*). A számos egyedi szerkezettel rendelkező összetételek két kategóriákba sorolhatóak: nem-porózus (bevont részecskék, szferoidok, PulmoSolTM technológia) (*Yang et al., 2012; White et al., 2005*) és porózus formulálások (LPP, nano-porózus mikrorészecskék, PulmoSphereTM technológia) (*Cruz et al., 2011; Tsapis et al., 2002*). Mindkét formulálási típus célja, hogy csökkentse a részecskék közötti adhéziót és speciális szerkezettel megfelelő aerodinamikát biztosítson a hatékony inhalációhoz (*Hoppentocht et al., 2014*). A könnyen irányítható részecskék és a pontosabban adagolható készítmény előállításához speciális segédanyagokat alkalmaznak: aeroszolizáció növelőket (pl. aminosavak, mannit) (*Moon et al., 2019*), szerkezet stabilizálókat (PVA, hialuronsav és más polimerek) vagy sűrűség csökkentőket (ammónium-karbonát, illékony oldószerek és már porozitás növelők) (*Vehring et al., 2008*;

Rövidítések:

AB – Ammónium-bikarbonát; API – Aktív gyógyszerészeti hatóanyag; CFD – Numerikus áramlástan (computational fluid dynamics); COPD – Krónikus obstruktív tüdőbetegség; D[0.5] – Geometriai átmérő; DPI – porinhalációs készítmény (dry powder inhaler); DMSO – dimetil-szulfoxid; EF – Emittált frakció; FDA – az USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (Food and Drug Administration); FPF – Finom részecske frakció; GSD – Geometriai standard deviáció; HA – Nátrium-hialuromát; IV – Belélegzett térfogat; LEU – L-leucine; LPP – Nagy átmérőjű porózus részecske (large porous particle); MMAD – Átlagos aerodinamikai átmérő (mass median aerodynamic diameter); MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid; MX – Meloxikám; MXP – Meloxikám kálium; NGI – Next generation impaktor; PVA – Poli vinil alkohol; S – Oldékonyság; SD – Porlasztva szárított; t_{b-h} – Belégzést követő levegő benntartási idő; t_{ex} – Kilégzési idő; t_{in} – Belégzési idő; XRPD – Porröntgen diffrakció.

Martinelli et al, 2017). Az optimális formulálás és előállítási technológia mellett nagyon fontos a megfelelő ellenőrző vizsgálatok elvégzése az inhalációs alkalmasság igazolásához. A leggyakrabban alkalmazott, gyógyszerkönyvben is hivatalos *in vitro* aerodinamikai módszerek mellett (Andersen-féle kaszkádimpaktor, NGI) (*Wong et al., 2010*) lehetőség van új CFD alapú (*Kerekes et al., 2013*) és *in silico* modellek alkalmazására is (*Farkas et al, 2017*). A modellezések realisztikus, betegre jellemző paramétereket (spirometriai adatok) és a szemcsék tulajdonságait (morfológia, sűrűség, aerodinamika) is figyelembe veszik, ezáltal jól alkalmazhatóak mind a készítmények aerodinamikai hatékonyságának ellenőrzésére, mind az összetételek optimalizálására a formulálás során.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- A Ph.D. munka célja, olyan meloxicám tartalmú **hordozómentes DPI** formulálása, amelyek vizes oldatból állíthatók elő, szerves oldószer alkalmazása nélkül, a következőképpen:
 - az Egis Gyógyszergyár Zrt. által szabadalmaztatott (*Mezei et al., 2012*), vízzoldékony **meloxicám-kálium** (MXP) felhasználásával és a **meloxicám** (MX) oldékonyság növelésével lúgos közegben.
- Mindkét hatóanyag esetében célunk volt **sejtéletképességi összehasonlító vizsgálatok** végzése A549 humán alveoláris epitel eredetű adenokarcinoma sejtek alkalmazásával.
- Célunk volt továbbá, a meloxicám tartalmú hordozómentes DPI előállítását, az FDA által javasolt (*FDA guidance, 2018*), iparban is alkalmazott **porlasztva szárítással** végezni (Büchi B-190 és B-290 készülékek).
- Célunk volt, a porlasztva szárítást kétféle hordozómentes DPI formulálással megvalósítani:
 - a MXP formulálását **nem-porózus** mikrokompozitok formájában, amelyek 1–5 µm-es részecskeméretűek és közel szférikusak, valamint
 - a MX formulálását nagy átmérőjű **porózus részecskék** (LPP) formájában, amelyek 5 µm-nél nagyobb részecskemérettel rendelkeznek és kis sűrűségűek (<0,20 g/cm³).
- Célunk, **összehasonlító tanulmány** végzése volt annak érdekében, hogy megállapítsuk az eltérő formulálással előállított minták fizikai-kémiai (szerkezet, morfológia, sűrűség) és aerodinamikai tulajdonságait. Az alkalmazott *in vitro-in silico* kombinált módszerrel realisabb körülmények között igazolható a készítmények aerodinamikai viselkedése és pulmonális alkalmazhatósága:
 - az *in vitro* aerodinamikai tulajdonságok meghatározását **Andersen-féle kaszkádimpaktor** segítségével végeztük, alacsony (30 l/perc-es) belégzési levegőáram modellezésével (*Eur. Ph. Online 9.6*), míg

- az *in silico* aerodinamikai modellezéseket az MTA Környezetfizikai Laboratóriuma által továbbfejlesztett **Sztochasztikus Tüdőmodellel** végeztük, amelyhez felhasználtuk klinikai vizsgálatból származó COPD-s betegek spirometriai adatait is.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott anyagok

3.1.1. Modell hatóanyagok

A formulálásra kiválasztott hatóanyagok a meloxicám-kálium (MXP) és meloxicám (MX) (Egis Gyógyszergyár Zrt., Budapest) (**I. táblázat**).

3.1.2. Segédanyagok

A formulálásoknál eltérő koncentrációkban alkalmaztunk L-leucint (LEU) (Sigma-Aldrich, USA), polivinil alkoholt (PVA) (ISP Customer Service GmbH, Németország), nátrium-hialuronátot (HA) (Acros Organics, Belgium) és ammónium-bikarbonátot (AB) (Sigma-Aldrich, USA) (**I. táblázat**).

3.2. Minta előállítás

3.2.1. Oldatkészítés és porlasztási körülmények

3.2.1.1. Nem-porózus részecskék előállítása

A MXP-t 70 ± 5 °C-os desztillált vízben oldottuk (10 perc, 400 rpm, AREC.X fűthető mágneses keverő, Velp Scientifica Srl, Olaszország), majd a 20 mg/ml-es vizes MXP oldatokban a megfelelő mennyiségű LEU-t oldottuk és a PVA oldatokat elegyítettük. Az **I. táblázat**ban feltüntetett paraméterek alkalmazásával porlasztottuk az oldatokat (*Chvatal et al., 2017*). Porlasztva szárítási paraméterek: Büchi B-191 mini porlasztva szárító, szárító levegő 140 °C, aspirátor teljesítmény 75%, levegőáramlás sebesség 600 l/óra, minta adagolási sebesség 2,5 ml/perc.

3.2.1.1. Porózus részecskék előállítása

A MX-ot pH $8,0 \pm 0,1$ kémhatású NaOH vizes oldatban, 1,5 mg/ml-es koncentrációban oldottuk fel. LEU-t és előzetesen készített HA oldatot adtunk az elegyekhez. Az AB-t közvetlenül a porlasztás előtt oldottunk fel. Porlasztásokat az **I. táblázat**ban feltüntetett paramétereken porlasztottuk (*Chvatal et al., 2019*). Porlasztva szárítási paraméterek: Büchi B-290 mini porlasztva szárító, szárító levegő 200 °C, aspirátor teljesítmény 100%, levegőáramlási sebesség 414 l/óra, mintaadagolási sebesség 9 ml/perc.

I. táblázat: A hordozómentes DPI részecskék összetétele a porlasztva szárításra szánt kiindulási oldatokban (mg/ml). *Referensként porlasztott hatóanyagok.

Kiindulási oldatok összetételei/Felhasznált anyagok					
Nem-porózus összetételek:					
<i>Funkció</i>	<i>Hatóanyag</i>	<i>Aerodinamika javító</i>	<i>Szerkezet stabilizáló</i>	—	
Anyag	MXP	LEU	PVA	—	
<i>MXP-SD*</i>	20	—	—	—	
MXP/LEU ²⁰	20	20	—	—	
MXP/LEU ⁴⁰	20	40	—	—	
MXP/LEU ²⁰ /PVA ^{2,5}	20	20	2,5	—	
MXP/LEU ⁴⁰ /PVA ^{2,0}	20	40	2,0	—	
Porózus összetételek:					
<i>Funkció</i>	<i>Hatóanyag</i>	<i>Aerodinamika javító</i>	<i>Szerkezet stabilizáló</i>	<i>Pórusképző</i>	
Anyag	MX	LEU	HA	AB	
<i>MX-SD*</i>	1,5	—	—	—	
MX/LEU/HA ^{0,30} /AB ^{1,5}	1,5	0,75	0,30	1,5	
MX/LEU/HA ^{0,15} /AB ^{1,5}	1,5	0,75	0,15	1,5	
MX/LEU/HA ^{0,30} /AB ^{2,0}	1,5	0,75	0,30	2,0	
MX/LEU/HA ^{0,15} /AB ^{2,0}	1,5	0,75	0,15	2,0	

3.2.2. Porlasztva szárítás hatékonysága

A porlasztva szárítás hatékonyságát a bemért ható- illetve segédanyag tömegek és a mintagyűjtő tartályban felfogott porlasztott termék tömegének százalékos arányával fejeztük ki. A minták tényleges hatóanyag tartalmát (%) spektrofotometriásan ellenőriztük (ATI-Unicam UV/VIS Spektrofotométer, Egyesült Királyság) 362 nm hullámhosszon. Minden esetben három párhuzamos porlasztást és mérést végeztünk (*Chvatal et al., 2019*).

3.3. Sejt-életképességi vizsgálat

A sejt-életképességi vizsgálatokat A549 humán alveoláris epitélsejt eredetű adenokarcinóma sejtvonalon végeztük (ATCC[®], USA). A mintáinkat eltérő hatóanyag koncentrációk szerint adtuk a sejtenyészetekhez, 1 órás expozíciós idő után a sejtek életképességét MTT teszt segítségével vizsgáltuk. A sejtek életképességének mértéket 570 nm-en mértük (Synergy H¹plate spektrofotométer, Biotek[®], VT) (*Chvatal et al., 2018*).

3.4. Szerkezeti vizsgálatok

3.4.1. Hatóanyag meghatározás (Raman spektroszkópia)

A porlasztva szárított hatóanyag meghatározását Thermo Fisher DXR diszperzív Raman spektrométerrel történt (Thermo Fisher Scientific. Inc., Egyesült Államok) (CCD kamera és 780 nm hullámhosszú diódalézer, 6-24 mW, 6 s expozíciós idő, 3300–200 cm⁻¹ között) (*Chvatal et al., 2019*).

3.4.2. Porróntgen diffrakciós analízis (XRPD)

A porróntgen diffrakciós vizsgálatokat Bruker D8 Advance diffraktométerrel (Bruker AXS GmbH., Németország) végeztük. Cu K λ 1 sugárzás ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), 40 kV feszültség és 40 mA áramerősség alkalmazása mellett 3 °-tól 40 °-ig (2θ) történt a szkennelés (sebesség 0,1 °/min, a lépésköz pedig 0,010 °).

3.5. Pásztázó elektronmikroszkópia

A szemcsék habitusát pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Hitachi S-4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A szemcséket arany-palládiummal vontuk be (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Egyesült Királyság), argon atmoszférában 1,3-13,0 mPa nyomású levegőt használtunk (*Chvatal et al., 2017*).

3.6. Szemcseméret meghatározás

A minták szemcseméret eloszlását Malvern Mastersizer 2000 Scirocco (Malvern Instruments Ltd., Egyesült Királyság) készülékkel vizsgáltuk. A program segítségével meghatároztuk a szemcsék átlagos geometriai átmérőjét ($D[0.5]$), valamint a méret szerinti eloszlás szélességét kifejező Span értéket.

3.7. Sűrűségvizsgálat

A termékek tömörített sűrűségét Pharma test PT-TD1 készülék segítségével (Pharma Test Apparatebau AG, Németország), 1000 ütést követően számoltuk (*Eur. Ph. Online 9.6*).

3.8. Aerodinamikai tulajdonságok meghatározása

3.8.1. In vitro vizsgálat

Andersen-féle kaszkádimpaktort (Copley Scientific LTd., Egyesült Királyság) alkalmaztuk, 30 ± 1 l/perc-es áramlási sebességet és $t_{in} = 4$ s állítottunk be (Breezhaler® egy adagos-keresztül). A kitapadt hatóanyag mennyiségeket spektrofotometriásan határoztuk meg (ATI-Unicam UV/VIS Spektrofotométer, Egyesült Királyság) $\lambda = 362$ nm-es hullámhosszon. Az abszorbanciákból KaleidaGraph program segítségével számítottuk az aerodinamikai tulajdonságokat (*Chvatal et al., 2019*): FPF ($< 5 \mu\text{m}$ átmérőjű és deponálódott részecskék %-a), EF (az impaktort elért hatóanyag-mennyiség %-a), MMAD (belégzés során kialakult részecskeméret, μm) és GSD (*Eur. Ph. Online 9.6, Chapter 2.9.18*).

3.8.2. In silico modellezés

A minták *in silico* modellezéséhez a továbbfejlesztett Sztochasztikus Tüdőmodellt alkalmaztuk (*Farkas et al., 2017*). A teljes körű elemzéshez bemenő adatként felhasználtuk a termékeink *in vitro* mért aerodinamikai paramétereit és COPD-s betegek spirometriai

adatait (*Chapman et al., 2011*) a Breehalyzer® egyadagos porbelégzőn keresztüli inhalációt. A modellel időben változó légzésprofil adatai: átlagos levegőáramlás 50,1 l/perc, $IV=1,70$ l, $t_{in}=2,04$ s, $t_{b-h}=5$ és 10 s, $t_{ex}=3,0$ s volt (*Chvatal et al., 2018*).

3.9. Stabilitás vizsgálat

Az aerodinamikai tulajdonságokat és azokat leginkább meghatározó paramétereket (részecskeméret, sűrűség) 1 és 10 hetes tárolás után is megvizsgáltuk. A mintákat kobalt-kristályos exikátorban, 23 ± 1 °C-on tároltunk (*Chvatal et al., 2019*). Az értékelések az adott eredményeknél külön-külön kerülnek tárgyalásra.

3.10. Statisztikai analízis

Minden vizsgálati eredményt három párhuzamos mérésből átlagoltuk ($n=3$), amelyek között tapasztalt eltéréseket Social Science Statistics internetes program segítségével egyszempontos varianciaanalízissel határoztuk meg, 0,05 szignifikancia szinten (szignifikáns változás $p<0,05$ esetén) (*Social Science Statistics Online*).

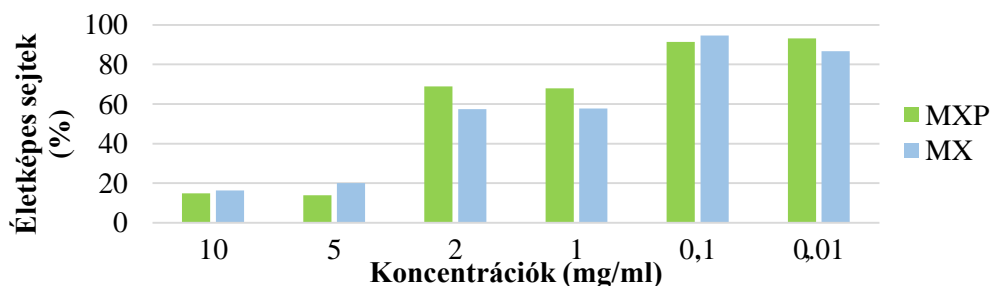
4. EREDMÉNYEK

4.1. Hordozómentes DPI készítmények előállítása

A nem-porózus és a porózus formulációkat is nagy kitermelési hatékonysággal ($>60\%$) lehetett előállítani, vizes oldatokból kiindulva. A kitermelési értékek kis szórást mutattak ($S.D. <3$), ami az eljárás reprodukálhatóságára utal. Az elméleti hatóanyagtartalmak jól korrelálnak a porlasztott termékek hatóanyag koncentrációkkal ($<10\%$ -os eltérés).

4.2. Hatóanyagok sejt-életképességre gyakorolt hatása

A vizsgálatban az MXP és az MX hatását vizsgáltuk a sejtek életképességére. Összevetve a negatív kontrollal, mind az MXP és az MX jelentős toxikus hatást fejtettek ki a sejtekre >1 mg/ml-es koncentrációkban (*Chvatal et al., 2017*). A 0,1 illetve 0,01 mg/ml-es koncentrációkban egyik hatóanyag sem volt toxikus a sejtekre. A vizsgálat bebizonyította, hogy nincs különbség az MXP és az MX sejtekre gyakorolt hatása között (*1. ábra*).

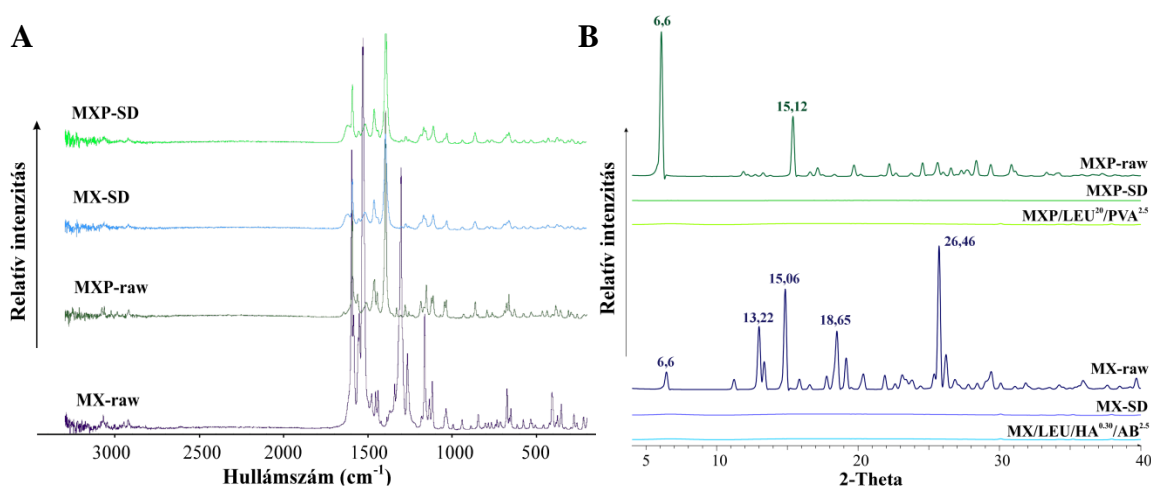


1. ábra: A kezeletlen MXP és MX hatásai A549 típusú sejtek életképességére. Az eredmények átlagokat mutatnak, $n=3$, $S.D. <0.1\%$ (*Chvatal et al., 2017*).

4.3. Szerkezeti vizsgálatok

4.3.1. Raman vizsgálatok

A kezeletlen és a porlasztva szárított MXP Raman spektruma között nem találtunk eltérést. Ezzel ellentétben, a MX 1155, 1309, 1540 és 1595 cm^{-1} mutattak karakterisztikus csúcsokat. A porlasztott MX Raman spektruma azonos volt az MX nátrium sójának spektrumával (*Bio-Rad Laboratories, Inc. SpectraBase; Meloxicam sodium*). Az eltérések arra utalnak, hogy az MX *in situ* sóképzéssel oldódik lúgos közegben ($\text{pH } 8,0 \pm 0,1$) és MXP formájában lesz jelen a porlasztott összetételekben (2. ábra A).



2. ábra: A nem-porózus és porózus formulálások és a referens minták Raman (A) és XRPD spektrumai (B). Porlasztva szárított hatóanyag=-SD, kezeletlen hatóanyag=-raw.

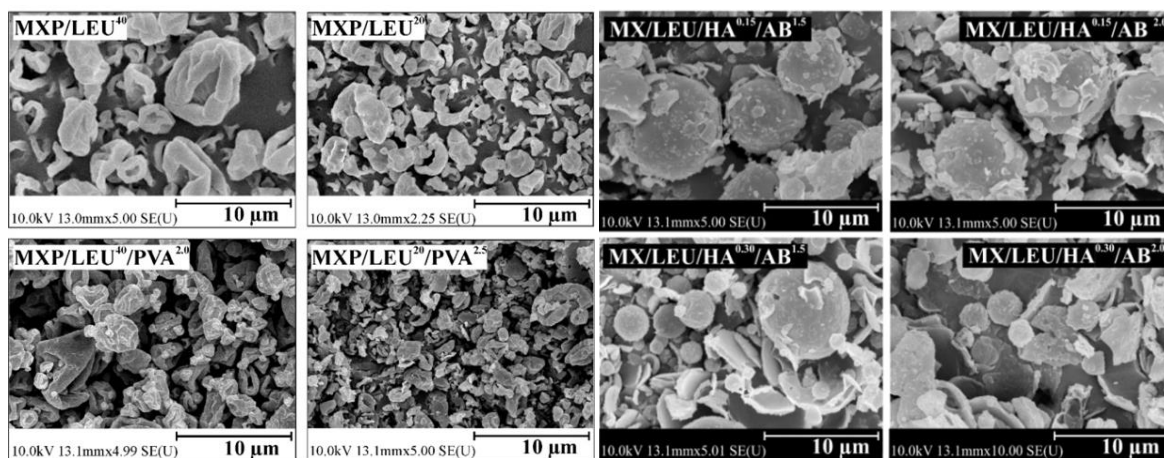
4.3.2. Porróntgen diffrakciós analízis

A kezeletlen hatóanyagok kristályos szerkezettel rendelkeznek, amelyet igazolnak az XRPD spektrumok éles csúcsai az MXP ($6,04^\circ$; $15,35^\circ$; $16,51^\circ$; $24,52^\circ$; $28,33^\circ$; $29,40^\circ$ és $30,94^\circ$ 2-theta) (*Chvatal et al., 2017*) és az MX esetében is ($13,22^\circ$; $15,06^\circ$ és $26,46^\circ$ 2-theta) (*Chvatal et al., 2019*). LEU jelenlétében minden formulálás szemi-kristályos szerkezettel rendelkezik, amelyet igazol a hatóanyagok és a LEU ($5,9^\circ$ 2-theta értéknél) kisebb intenzitású karakterisztikus csúcsainak megjelenése (2. ábra B). Az alkalmazott koncentrációkban a polimereknek (PVA és HA) nem volt hatása az összetételek kristályos/amorf szerkezeti változásaira.

4.4. Elektronmikroszkópos eredmények

A kezeletlen MXP és MX $50 \mu\text{m}$ feletti, szögletes kristályos szerkezettel jellemezhető, amely alkalmatlan a terápiás célú inhalációra. Ezzel szemben a referensként porlasztott hatóanyagok (MXP-SD és MX-SD) enyhén egyenetlen felszínű, közel szférikus morfológiával rendelkeznek, míg a nem-porózus összetételek horpadt felszínű, fánk-alakú

morfológiát mutatnak. A LEU kis diffúziós koefficiensének köszönhetően felhalmozódik a száradó csepp felszínén, kialakítva ezzel a jellemzően „kagyló” vagy „fánk” formát (3. *ábra*). A kialakított speciális morfológiák stabilizálásában a polimereknek (PVA és HA) nagy szerepük van, de jelentősebb hatásuk az egyedi szemcsék alakjára és felszíni tulajdonságaira nincs. A porózus részecskék jelentősen eltérő morfológiával rendelkeznek a nem-porózus részecskékhez viszonyítva, amely az AB tartalomnak köszönhető. A porlasztva szárítás folyamán az AB bomlásából keletkező CO₂ és NH₃ gázok „felfújják” a szemcséket és nagyméretű, szférikus gömböket alakít ki (3. *ábra*). Ennek eredményeként kisebb lesz a szemcsék közötti adhézió és jól diszpergáltak a termékek.



3. *ábra*: A nem-porózus és a porózus összetételek elektronmikroszkópos képei.

4.5. Részecskeméret analízis

A referensként porlasztott hatóanyagok (MXP-SD és MX-SD) geometriai átmérője 3,0–3,2 µm. A 20 mg/ml LEU tartalmú nem-porózus formulálások átmérője szintén 3 µm körüli. Magasabb LEU koncentrációk növelték a részecskeméretet (40 mg/ml LEU tartalom esetén 3,6 µm), azonban ez a változás már nem volt szignifikáns PVA jelenlétében (3,3–3,5 µm). Minden nem-porózus összetétel geometriai átmérője a célul kitűzött 1–5 µm-es mérettartományba esik és monodiszperz méreteloszlással rendelkezett (Span <1,8). A részecskeméret eloszlások 1 és 10 hét tárolás után sem mutattak szignifikáns eltérést (II. *táblázat*). A porózus összetételek esetében is elértük a célul kitűzött >5 µm-es részecskeméret tartományt (4,9–5,7 µm). A geometriai átmérő jelentősen megnövekedett AB és HA segédanyag kombinációk alkalmazása során. A részecskeméret és nagyobb HA koncentráció között egyenes arányosság (0,15 mg/ml esetén 5 µm, míg 0,30 mg/ml esetén 5,7 µm), míg a részecskeméret és AB koncentráció között nem volt kimutatható arányosság. Minden porózus formulálás esetében monodiszperz méreteloszlás volt detektálható (Span

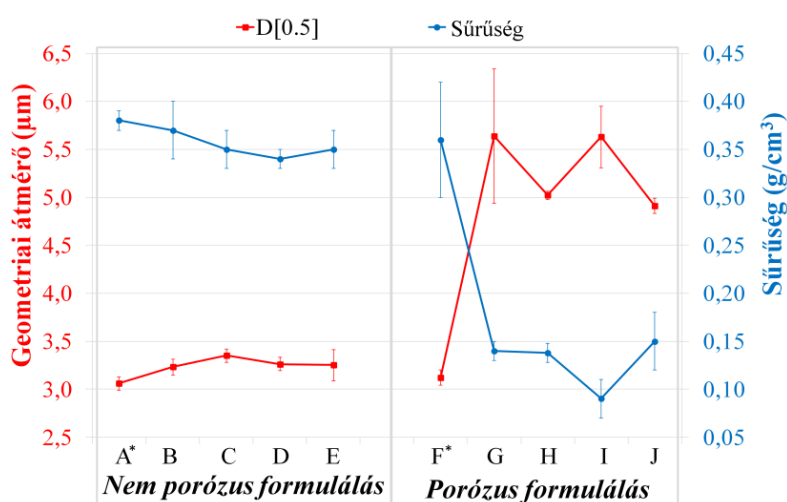
<2,0). A 10 hetes tárolás nem okozott változást a porózus formulálások részecskeméret eloszlásában.

II. táblázat: A hordozómentes DPI formulálások részecskeméret eloszlása. Az értékek átlagokat fejeznek ki \pm S.D., $n=3$. *Referensként porlasztott hatóanyagok.

	D[0.5] (μm)		Span	
	1. hét	10. hét	1. hét	10. hét
Nem-porózus formulálás				
MXP-SD*	3,1 \pm 0,07	3,0 \pm 0,03	1,3 \pm 0,10	1,4 \pm 0,32
MXP/LEU ²⁰	3,1 \pm 0,52	3,2 \pm 0,09	1,6 \pm 0,73	1,5 \pm 0,58
MXP/LEU ⁴⁰	3,6 \pm 0,06	3,4 \pm 0,15	1,8 \pm 0,04	1,8 \pm 0,17
MXP/LEU ²⁰ /PVA ^{2,5}	3,4 \pm 0,24	3,5 \pm 0,03	1,8 \pm 0,11	1,6 \pm 0,15
MXP/LEU ⁴⁰ /PVA ^{2,0}	3,5 \pm 0,73	3,3 \pm 0,20	1,7 \pm 0,10	1,8 \pm 0,15
Porózus összetételek				
MX-SD*	3,2 \pm 0,08	3,0 \pm 0,03	1,4 \pm 0,08	1,5 \pm 0,10
MX/LEU/HA ^{0,30} /AB ^{1,5}	5,6 \pm 0,73	5,6 \pm 0,09	2,0 \pm 0,10	1,8 \pm 0,11
MX/LEU/HA ^{0,15} /AB ^{1,5}	5,0 \pm 0,60	5,0 \pm 0,25	1,9 \pm 0,22	1,6 \pm 0,13
MX/LEU/HA ^{0,30} /AB ^{2,0}	5,6 \pm 0,64	5,7 \pm 0,36	2,0 \pm 0,13	2,0 \pm 0,12
MX/LEU/HA ^{0,15} /AB ^{2,0}	4,9 \pm 0,60	5,0 \pm 0,09	1,9 \pm 0,31	1,8 \pm 0,25

4.6. Sűrűség meghatározása

A referensként porlasztott hatóanyagok tömörített sűrűsége átlagosan 0,37 g/cm³ (4. ábra). A nem-porózus összetételeknek szignifikánsan nagyobb a sűrűsége ($\geq 0,33$ g/cm³) a porózus összetételekhez viszonyítva (<0,17 g/cm³) annak ellenére, hogy a porózus részecskék sokkal nagyobb geometriai átmérővel rendelkeznek (4. ábra). A porózus részecskék kis sűrűsége (0,09–0,16 g/cm³) az AB tartalomnak köszönhető, amely csökkenti a részecskék tömegét. Sem az összetételek eltérő AB tartalmának, sem a felhasznált polimereknek nem volt hatása a tömörített sűrűsége.

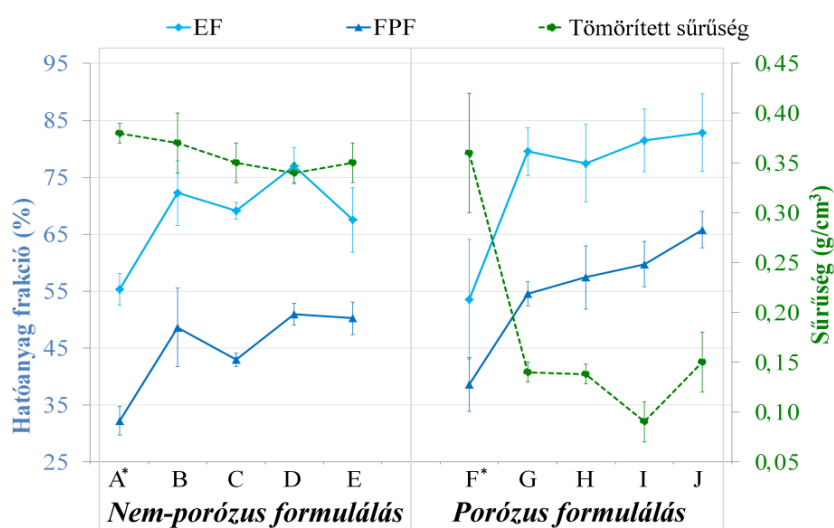


4. ábra: A geometriai átmérő (D[0.5]) összehasonlítása a részecskék tömörített sűrűségével (B: MXP/LEU²⁰, C: MXP/LEU⁴⁰, D: MXP/LEU²⁰/PVA^{2,5}, E: MXP/LEU⁴⁰/PVA², G: MX/LEU/HA^{0,3}/AB^{1,5}, H: MX/LEU/HA^{0,15}/AB^{1,5}, I: MX/LEU/HA^{0,3}/AB², J: MX/LEU/HA^{0,15}/AB²). *Referens minták: A: MXP-SD and F: MX-SD. Az értékek átlagokat fejeznek ki \pm S.D., $n=3$

4.7. Aerodinamikai tulajdonságok meghatározása

4.7.1. In vitro vizsgálat eredményei

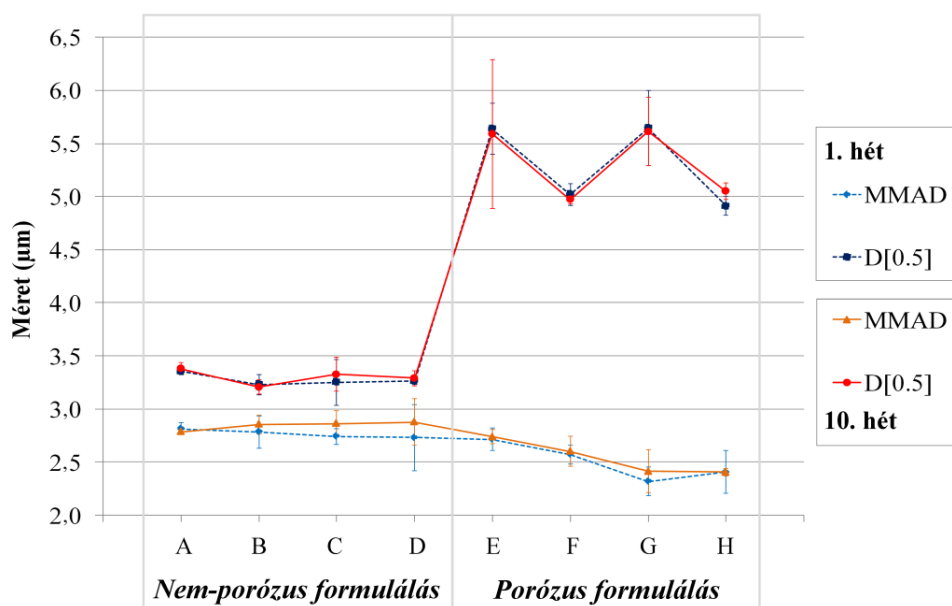
A referensként porlasztott hatóanyagok tulajdonságai kedvezőtlen aerodinamikai viselkedést mutattak, ezért nem lennének alkalmasak inhalációs terápiára ($EF \leq 59,1\%$ míg $FPF \leq 38,6\%$) (5. ábra). A nem-porózus összetételek jóval meghaladták az referensként porlasztott hatóanyagok tulajdonságait. A nagyobb LEU tartalmú összetételek (40 mg/ml) esetében növekedett az emittált dózis, míg az FPF értékek változatlanok maradtak. Összehasonlítva a nem-porózus összetételeket megállapítható, hogy a csak LEU és a LEU+PVA tartalmú minták aerodinamikája között nem volt szignifikáns eltérés. A porózus összetételek kis sűrűségének és porózus szerkezetének köszönhetően kiemelkedőbb aerodinamikai tulajdonságok figyelhetők meg FPF (54,5–65,8%). A legmagasabb tüdődepozíciós érték a 2,0 mg/ml AB-t is tartalmazó MX/LEU/HA^{0,15}/AB² minta esetében várható (FPF=65,8%). A nagyobb AB koncentráció magasabb emittált frakciókat eredményezett ($EF > 79,5\%$). Ezzel szemben az alkalmazott HA koncentrációknak nem volt szignifikáns hatása az aerodinamikára (Chvatal et al., 2019).



5. ábra: Az emittált (EF) és finomrészecske frakciók (FPF) összehasonlítása a részecskék tömörített sűrűségével (B: MXP/LEU²⁰, C: MXP/LEU⁴⁰, D: MXP/LEU²⁰/PVA^{2,5}, E: MXP/LEU⁴⁰/PVA², G: MX/LEU/HA^{0,3}/AB^{1,5}, H: MX/LEU/HA^{0,15}/AB^{1,5}, I: MX/LEU/HA^{0,3}/AB², J: MX/LEU/HA^{0,15}/AB²).
*Referens minták: A: MXP-SD and F: MX-SD. Az értékek átlagokat fejeznek ki \pm S.D., $n=3$.

A 6. ábra jól szemlélteti a porózus részecskék formulálásának jelentőségét az inhalációs terápiában. Annak ellenére, hogy a porózus összetételek nagyobb geometriai átmérővel rendelkeznek ($D[0.5]=4,9-5,7 \mu\text{m}$), mint a nem-porózus részecskék ($D[0.5]=3,0-3,6 \mu\text{m}$), az MMAD értékek mindkét esetben a követelményeknek megfelelő 1–5 μm -es aerodinamikai mérettartományba estek. A nem-porózus részecskék MMAD értékének meghatározó tényezője a geometriai átmérő volt, míg a porózus összetételek esetében a szerkezet növelte

a részecskék aerodinamikai hatékonyságát. Amíg a nem-porózus összetételek esetében mindössze 1 μm különbség van a geometriai és aerodinamikai átmérők között, addig a porózus összetételek esetében ez átlagosan 2,8 μm . Sem a HA, sem a LEU nem befolyásolta az MMAD értékét, ezzel szemben az AB koncentráció növelése kedvezően hatott az aerodinamikára és kisebb MMAD értékeket eredményezett (2,3–2,4 μm), mint az alacsonyabb AB koncentráció (2,6–2,7 μm).



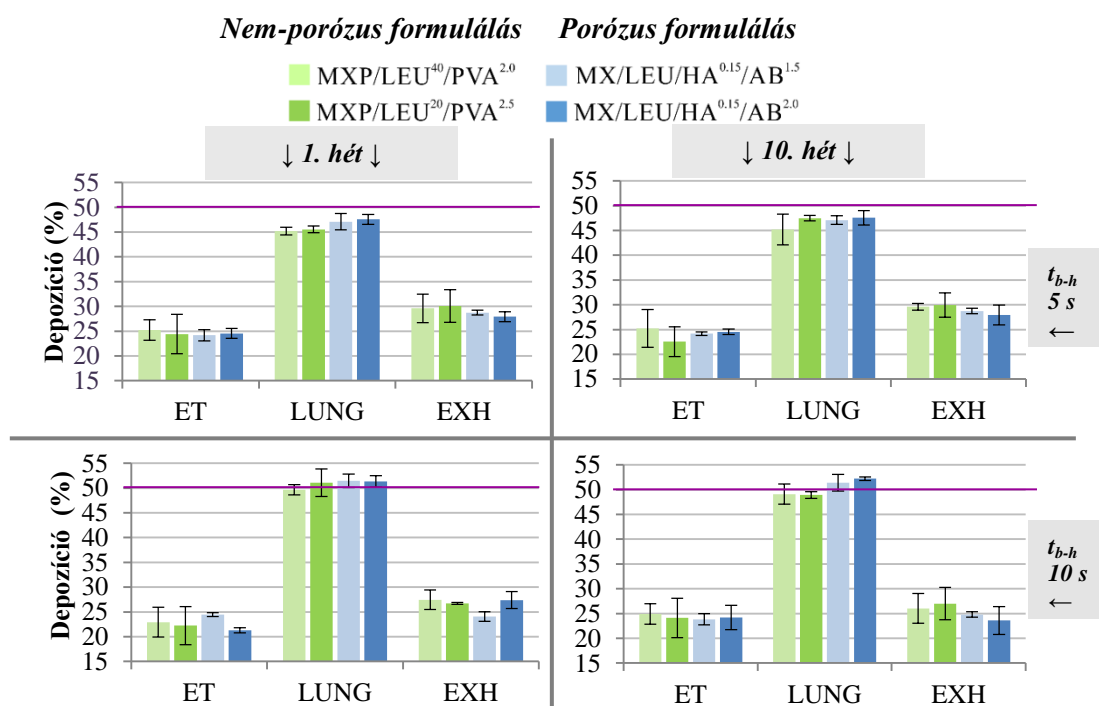
6. ábra: A formulálások geometriai (D[0.5]) és átlagos aerodinamikai átmérőinek (MMAD) összehasonlítása: A: MXP/LEU^{20} , B: MXP/LEU^{40} , C: $\text{MXP/LEU}^{20}/\text{PVA}^{2.5}$, D: $\text{MXP/LEU}^{40}/\text{PVA}^2$, E: $\text{MX/LEU/HA}^{0.3}/\text{AB}^{1.5}$, F: $\text{MX/LEU/HA}^{0.15}/\text{AB}^{1.5}$, G: $\text{MX/LEU/HA}^{0.3}/\text{AB}^2$, H: $\text{MX/LEU/HA}^{0.15}/\text{AB}^2$. Az értékek átlagokat fejeznek ki \pm S.D., $n=3$.

A 10 hetes tárolás sem okozott szignifikáns változást a nem-porózus és porózus összetételek aerodinamikai tulajdonságaiban. Összegzőként elmondhatjuk, hogy a kisebb sűrűségű ($<0,17 \text{ g/cm}^3$) és nagy geometriai átmérőjű porózus összetételek jobb aerodinamikai tulajdonsággal rendelkeznek ($\text{EF} \geq 76,1\%$ and $\text{FPF} \geq 54,5\%$), mint a kisebb méretű, de tömörebb szerkezetű nem-porózus formulációk ($\text{EF} \leq 62,1\%$ and $\text{FPF} \leq 41,2\%$).

4.7.2. In silico modellezés

Az *in silico* modellezés során megállapítható, hogy a 10 s levegő benntartási idő 5-12%-ak magasabb tüdődepozíciót eredményezett ($>48,9\%$), mint 5 s modellezések ($<47,5\%$) (7. ábra). A felsőlégúti kitapadásban nem volt eltérés a két formulálási típus között és a légzésszünet időtartama se befolyásolta az eredményeket (21-25%). Ennek ellenére, a porózus összetételek kilélegzett frakciói alacsonyabbak voltak (23-27%), mint a nem-porózus összetételek esetében (26-27%). A tüdődepozíciós eredmények jól összevethetőek az Andersen-féle kaszkádimpaktorról számolt FPF értékekkel. A 10 hetes tárolás nem okozott szignifikáns változást sem a nem-porózus és sem porózus összetételek *in silico*

aerodinamikai tulajdonságaiban. A bemutatott hordozómentes összetételek minden esetben meghaladták a hasonló módszerekkel vizsgált forgalomban lévő DPI tüdődepozícióit (Jókai *et al.*, 2016).



7. ábra: *In silico* modellezés eredményei. ET=felső légúti kitapadás, LUNG= tüdő kitapadás és EXH=kilélegzett frakció. Az értékek átlagokat fejeznek ki ±S.D., n=3.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A bemutatott Ph.D. munka célja volt, MX tartalmú hordozómentes DPIok fejlesztése. Az oldatos formából történő előállítás (porlasztva szárítással) nem igényelt szerves oldószer felhasználást, ezzel környezetbarát technológiát biztosítva.

Kidolgoztunk egy formulálási és vizsgálati protokollt, amely az inhalációra szánt termékek teljes körű fizikai-kémiai, szerkezeti, morfológiai és aerodinamikai (*in vitro* és *in silico*) analizését teszi lehetővé. Az előállított nem porózus és porózus szerkezetű összetételek között összehasonlító vizsgálatokat végeztünk azzal a céllal, hogy meghatározzuk az egyes formulációk alkalmasságát az inhalációs terápiában (III. táblázat).

Megállapítottuk, hogy a modell hatóanyag mindkét formája (MXP és MX) biztonságosnak tekinthető A549-es humán alveoláris sejtvonalon 0,1 mg/ml-es koncentrációig, így alkalmas lehet COPD és egyéb tüdőt érintő gyulladásos betegségek lokális kezelésére. Az előállított formulációk *in vitro* mért és validált *in silico* körülmények között modellezett aerodinamikai tulajdonságai is kiemelkedő eredményeket mutattak, így az előállított DPIok alkalmasak

lehetnek hatékony inhalációs terápiára (**III. táblázat**). A vizsgált termékek stabilitási vizsgálata is kedvező eredménnyel zárult. A kombinációs aerodinamikai analízis alkalmazásának kiemelkedően fontos szerepe lehet a jövőbeli fejlesztések során: nem csak az összetételek optimalizálását segíti, de a realisztikus paraméterek alkalmazásával előrevetíti a készítmények *in vivo* hatékonyságát is.

III. táblázat: A minták összehasonlító vizsgálatának eredményei.

	Nem-porózus formulálás	Porózus formulálás
Hatóanyag	MXP: 20 mg/ml	MX: 1,5 mg/ml
Segédanyagok	LEU: 40–20 mg/ml PVA: 2–2,5 mg/ml	LEU: 0,75 mg/ml HA: 0.15–0.3 mg/ml AB: 1,5–2 mg/ml
Kitermelés	60–64%	61–70%
Morfológia	kagyló-alak, egyenetlen felszín	szférikus, porózus szerkezet
Geometriai átmérő	3,0–3,8 μm	4,9–5,6 μm
Sűrűség	0,30–0,42 g/cm ³	0,09–0,16 g/cm ³
<i>In vitro aerodinamikai tulajdonságok (30 l/perc):</i>		
EF	67–78%	77–90%
FPF	42–53%	54–70%
MMAD	2,6–3,0 μm	2,2–2,8 μm
GSD	1,3–1,5	1,7–2,0
<i>In silico aerodinamikai tulajdonságok ($t_{b-h}=10$ s):</i>		
Felső légúti	22–24%	21–25%
Tüdő	48–51%	51–52%
Kilégelt	26–27%	23–27%

Az eredmények gyakorlati jelentősége:

- A munka tudományos újdonsága, hogy elsőként állítottunk elő hordozómentes DPI-formát, a meloxicám vizes oldataiból szerves oldószer felhasználása nélkül: az újonnan szabadalmaztatott MXP és az *in situ* (pH eltolással) képződött MX nátrium só alkalmazásai megkönnyítették a vizes oldatos formulálást és a porlasztva szárítás nagy kitermelésű (60–70%), jól reprodukálható termékeket eredményezett.
- Elsőként dolgoztunk ki formulálási és vizsgálati protokollt két különböző típusú (nem-porózus és porózus) hordozómentes DPI előállítására.
- Mind a nem-porózus és mind a porózus összetételek kiemelkedő *in vitro* és *in silico* aerodinamikai tulajdonságokkal rendelkeztek, amelyek meghaladják a jelenleg forgalomban lévő inhalációs készítmények hasonló értékeit. Ennélfogva alkalmasak lehetnek pulmonális fibrózis, COPD és egyéb tüdőt érintő gyulladásos megbetegedések lokális kezelésére.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. A. Chvatal**, R. Ambrus, P. Party, G. Katona, O. Jójárt-Laczkovich, P. Szabó-Révész, E. Fattal, N. Tsapis. *Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery.*
International Journal of Pharmaceutics 559 (2019) 68-75. **IF: 3,862, Q1**
- II. A. Chvatal**, Á. Farkas, I. Balásházy, B. Hopp, P. Szabóné-Révész, R. Ambrus. *Új generációs meloxikám-kálium tartalmú inhalációs készítmények fejlesztése és in vitro-in silico aerodinamikai tulajdonságainak vizsgálata.*
Acta Pharmaceutica Hungarica 88 (2018) 3–8. **IF:-**
- III. A. Chvatal**, R. Alzhrani, A. K. Tiwari, R. Ambrus, Piroška Szabó-Révész, S. HS. Boddu. *Cytotoxicity of inhalable dry powders in A549 human lung cancer cell line.*
Farmacia 66 (1) (2018) 172–175. **IF: 1,507, Q2**
Idézettség: 1
- IV. A. Chvatal**, Á. Farkas, I. Balásházy, P. Szabó-Révész, R. Ambrus. *Structural and aerodynamic evaluation of microcomposites containing meloxicam potassium.*
International Journal of Pharmaceutics 520 (2017) 70–78. **IF: 3,862, Q1**
Idézettség: 11
- V. A. Chvatal**, E. Benke, P. Szabó-Révész, R. Ambrus. *Új formulálási stratégiák a porinhalációs készítmények előállításában.*
Gyógyszerészet 60 (4) (2016) 197–206. **IF:-**
- VI. A. Pomázi, A. Chvatal**, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *Porinhalációs készítmények formulálásának lehetőségei és gyógyszerforma vizsgálata*
Gyógyszerészet 58 (3) (2014) 131-139. **IF:-**

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

- XIII: Magyar Aeroszol Konferencia, **A. Chvatal**, Á. Farkas, I. Balásházy, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *Új generációs DPI készítmények formulálása, aerodinamikai és citotoxicitás vizsgálata.* Pécs, 2017 (szóbeli előadás).
- XII. Clauder Ottó emléktverseny, **A. Chvatal**: *Új generációs DPI készítmények fejlesztése és aerodinamikai tulajdonságainak vizsgálata*, Budapest, 2016 (szóbeli előadás).
- Richter Gedeon Rt. Centenárium Alapítvány Előadóülés, **A. Chvatal**: *Meloxikám-kálium tartalmú porinhalációs rendszerek vizsgálata kaszkádimpaktor és sztochasztikus tüdőmodell alkalmazásával.* Budapest, 2016 (szóbeli előadás).
- Tudományos Diákköri Konferencia, **A. Chvatal**: *Meloxikám-kálium tartalmú mikrokompozitok fejlesztése és vizsgálata inhalációs célra.* Szeged, 2015 (szóbeli előadás).
- Tudományos Diákköri Konferencia, **A. Chvatal**: *Ko-porlasztott meloxikám-kálium tartalmú mikrokompozitok vizsgálata porinhalációs készítmények fejlesztése céljából.* Szeged, 2015 (szóbeli előadás).
- A. Chvatal**, P. Party, Á. Farkas, I. Balásházy, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, E. Fattal, N. Tsapis. *In vitro and in silico evaluation of carrier-free porous inhalable particles.* P9/4,

12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged, Hungary 2018 (poszter előadás).

7. R. Ambrus, **A. Chvatal**, E. Benke, Á. Zsembery, P. Szabó-Révész. *Development of new generation-formulation containing different water-soluble model drugs for dry powder inhalation*. P-136, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain 2018 (poszter előadás).
8. **A. Chvatal**, R. Alzhrani, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, A. K. Tiwari, S. HS. Boddu. *Cytotoxicity and aerodynamical testing of spray dried meloxicam forms for inhalation*. 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) Stockholm, Sweden, 2017 (poszter előadás).
9. **A. Chvatal**, Á. Farkas, I. Balásházy, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *In vitro and in silico aerodynamical testing of carrier-free DPI formulations*. 2nd European Conference on Pharmaceutics, Novel dosage forms and innovative technologies, Krakow, Poland 2017 (poszter előadás).
10. **A. Chvatal**, Á. Farkas, I. Balásházy, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *Meloxikám-kálium tartalmú porinhalációs rendszerek vizsgálata kaszkádimpaktor és sztochasztikus tüdőmodell alkalmazásával*. Gyógyszer technológiai és Ipari Gyógyszerészeti Konferencia, Siófok, 2015 (poszter előadás).
11. **A. Chvatal**, A. Pomázi, P. Szabó-Révész, R. Ambrus. *Aerodynamic and structural evaluation of microcomposites containing meloxicam potassium*. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, Reims, France 2015 (poszter előadás).
12. **A. Chvatal**, A. Pomázi, P. Szabó-Révész, R. Ambrus. *Meloxikám kálium tartalmú mikrokompozitok szerkezeti és aerodinamikai vizsgálata*. XII: Magyar Aeroszol Konferencia, Szeged, 2015 (poszter előadás).
13. **A. Chvatal**, A. Pomázi, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *Meloxicam-tartalmú porinhalációs készítmény stabilitásának vizsgálata*. XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2014 (poszter előadás).
14. A. Pomázi, **A. Chvatal**, R. Ambrus, P. Szabó-Révész. *Ko-porlasztással előállított mikrorészecskék vizsgálata porinhalációs készítmények formulálása céljából*. XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2014 (poszter előadás).



A munka a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program és a Richter Nyrt., Budapest GINOP-2.2.1-15-2016-00007 projekt keretein belül valósult meg.

A munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-17-3-I-SZTE kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával valósult meg.

Szeretnék köszönetet mondani a tanulmányutak megvalósulásához nyújtott támogatásért az Egyesült Államokbeli Toledó és Szeged gyógyszerészkarai között fennálló együttműködésnek, a Tempus Közalapítvány és Emberi Erőforrások Minisztériuma által kezelt Campus Mundi programnak és a SimInhale COST Action MP1404 – STSM támogatási programnak.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Szabóné Dr. Révész Piroskának és Dr. Ambrus Ritának, valamint ko-operációs partnereinknek a munkám során nyújtott szakmai támogatásért.